

製品 KOD FX を用いた実施例

## ホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出したDNAの解析

データご提供 福岡大学 医学部 病理学講座 石黒晶子先生、竹下盛重先生、福重智子先生

ホルマリン固定を行った組織から抽出したDNAは切断、化学修飾等の影響を受けているため、PCR効率が極度に低下することが知られています。今回、このようなDNAサンプルを用いて、高効率に増幅する方法をご紹介します。

### 実験方法

**サンプル** ホルマリン固定パラフィン包埋材料（ヒト）  
（今回使用した切片の厚さは約10 $\mu$ mで、大きさは1cm $\times$ 2cm程度）

**前処理** 5~10 $\mu$ mパラフィン包埋切片を1.5mlチューブに移す



**脱パラフィン**

キシレンを入れ5分放置後遠心してキシレンを除去  
（3回繰り返す）



**脱キシレン**

100%エタノールを入れ5分放置してエタノールを除去  
（4回繰り返す）



エタノールを除いた後、70 $^{\circ}$ C・5分でエタノールを完全に除去



10mM Tris-HCl (pH 8.0) 300 $\mu$ l<sup>\*1</sup>を加えた後<sup>\*2</sup>、Proteinase K  
(10mg/ml) を10 $\mu$ l加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩放置<sup>\*3,4</sup>



加熱処理 (70 $^{\circ}$ C、10 min)  $\Rightarrow$  そのままPCR用サンプルとして使用<sup>②</sup>



カラム精製 (シリカメンブレンを用いたスピンカラムタイプを使用)  
 $\Rightarrow$  DNA鋳型として使用<sup>①</sup>

※1 本実験では、10mM Tris-HCl (pH 8.0) を300 $\mu$ l添加していますが、サンプル量に応じて50~300 $\mu$ lを使用します。Proteinase Kはその量に応じて、増減させてください。

※2 切片が大きいときは、bufferを加えた後、眼科用のはさみで1mm以下になるぐらいまで細かく切ってからProteinase Kを添加します。

※3 37 $^{\circ}$ Cで一晩おいて未消化の組織が多いときは、さらに5~10 $\mu$ l Proteinase Kを加えて2~3時間消化します。

※4 組織の細胞密度や種類によって消化の具合はかなり変化します。線維組織はProteinase Kで消化されないため、筋肉や膜などが多い組織は完全には溶解しません。

**ターゲット** Human  $\beta$ -globin 268bp

**プライマー\*** Primer F: GAAGAGCCAAGGGCAGGTAC  
Primer R: CAACTTCATCCACGTTCCACC

\*参考文献: *Am.J.Pathol.* **154**; 67-75,1999

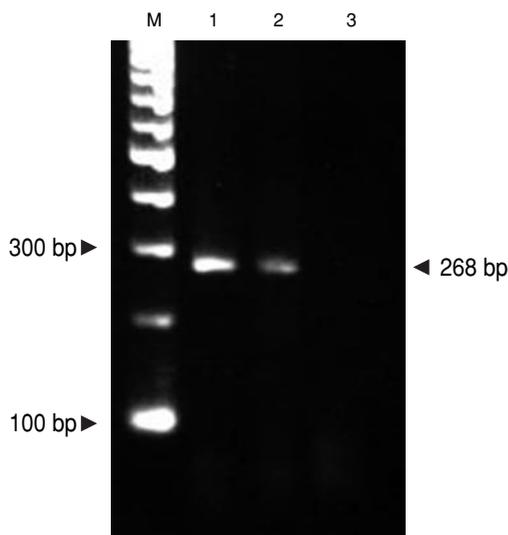
<b>反応溶液</b>	滅菌蒸留水	3.6 (μl)
	2×PCR buffer for KOD FX	10
	2mM dNTPs	4
	10pmol / μl Primer F	0.5
	10pmol / μl Primer R	0.5
	KOD FX (1.0U / μl)	0.4
	精製DNA or ライセート	1*
	<b>Total</b>	<b>20</b>

\* Proteinase K処理後のライセートは1μlを目安に添加します。  
精製DNAの添加量は、20μl反応系で約100ngを目安にします。組織の量が少なかった場合は回収量が少なくなりますので、カラムから最少量でDNAを溶出し、適量を添加します。添加量が1μlを超える場合は、滅菌蒸留水の量を調整します。

**PCRサイクル** 94℃ 15 min\*\*  
↓  
98℃ 10 sec ←  
57℃ 30sec } 38 cycles  
68℃ 30sec

\*\* ホルマリン固定組織から得られたDNAの増幅では、最初の変性ステップを7~15分程度に設定することで良好な結果を得ることができるようです。

**結果**



M: 100bp DNA Ladder  
1: Proteinase K処理後、カラム精製したDNA①  
2: Proteinase K処理後、70℃10分処理したクルードサンプル②  
3: DW  
〈アプライ量: 2μl / Lane〉

**先生からのコメント**

他社のポリメラーゼを用いた場合、精製DNAを用いても増幅できない検体が多かった。一方、KOD FXを用いることで精製DNA及び、Proteinase K処理後のパラフィン包埋材料のライセートから高効率にPCR産物を得ることができた。小さな組織の場合、精製するとDNAがより少なくなるので、精製しないでPCRに使えるのが良い。

高成功率PCR酵素 **KOD FX**



包装	Code No.	価格
200U ×1本	KFX-101	¥35,000
(200U ×1本) ×5	KFX-101X5	¥140,000
(200U ×1本) ×10	KFX-101X10	¥260,000

KOD FXは、マウステールライセート、植物ライセート、血液など様々なクルードサンプルから直接、高効率なPCRを行うことができます。  
実施例は弊社ウェブサイト (<http://www.toyobo.co.jp/bio>) KOD FXコーナーで公開しております。是非一度ご覧ください。